

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 47/48</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/15810</b> (43) Date de publication internationale: 30 mai 1996 (30.05.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01517</p> <p>(22) Date de dépôt international: 17 novembre 1995 (17.11.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/13861 18 novembre 1994 (18.11.94) FR</p> <p>(71)(72) Déposant et inventeur: GEFFARD, Michel [FR/FR]; 200, avenue de Thouars, F-33400 Talence (FR).</p> <p>(74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: MONOFUNCTIONAL AND/OR POLYFUNCTIONAL POLYLYSINE CONJUGATES</p> <p>(54) Titre: CONJUGUES MONOFONCTIONNELS ET/OU POLYFONCTIONNELS DE LA POLYLYSINE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The use of polylysine for preparing pharmaceutical compositions or combinations useful for treating neural degeneration, infectious, traumatic and toxic neuropathies, auto-immune degenerative diseases and proliferative diseases, is disclosed. Polylysine conjugates are also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne l'utilisation de conjugués de la polylysine pour la préparation de compositions ou associations pharmaceutiques utiles dans le traitement de la dégénérescence neuronale, des neuropathies infectieuses, traumatiques et toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmun et des affections prolifératives. L'invention concerne également des conjugués de la polylysine.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## CONJUGUES MONOFONCTIONNELS ET/OU POLYFONCTIONNELS DE LA POLYLYSINE

5

La présente invention concerne le domaine médical. Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation d'au moins un conjugué monofonctionnel et/ou polyfonctionnel de la polylysine pour la préparation de compositions ou associations pharmaceutiques utiles dans le traitement de la dégénérescence neuronale, des neuropathies infectieuses, traumatiques et  
10 toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmun, des troubles neurodégénératifs consécutifs à des affections génétiques et des affections prolifératives. L'invention concerne également des conjugués monofonctionnels et polyfonctionnels de la polylysine.

La majorité des affections humaines chroniques invalidantes, telles que la sclérose en  
15 plaques (SEP), les polyarthrites (PR), les neuropathies, etc., n'ont pas d'étiologie clairement définie. Par conséquent, les traitements actuellement pratiqués restent symptomatiques : utilisation de corticoïdes, d'anti-inflammatoires divers, d'immunodépresseurs, etc.; ces médications présentent de nombreux effets secondaires non négligeables pour la santé des patients. De plus, leur efficacité est fugace. On ne note pas d'amélioration durable et surtout  
20 peu d'amélioration dans l'évolution de ces affections.

Des données et travaux récents sur l'auto-immunité (Daverat et al. 1989 (1), Amara et al., 1994 (2)) ont permis d'identifier des cibles antigéniques chimiquement définies par les anticorps circulant dans les fluides biologiques des malades. L'élévation de ces immunoglobulines circulantes est liée à l'évolution de ces maladies. Les anticorps  
25 n'apparaissent plus comme des éléments aberrants mais sont le reflet de désordres antigéniques précis.

A titre d'exemple, on a identifié des anticorps dirigés contre l'acide oléique conjugué, l'acide azélaïque conjugué, un phospholipide et le cystéinyl-NO dans la SEP (Maneta-Peyret et al., 1987 (3) ; Daverat et al., 1989 (1) ; Brochet et al., 1991 (4) ; Boulleme et al.,  
30 1994 (5)).

De même lors de l'infection par le virus du VIH, des anticorps dirigés contre les acides gras couplés par liaison amide ont été trouvés (Amara et al., 1994 (2)).

La demande WO 94/27151, publiée le 24 novembre 1994, décrit l'utilisation d'au moins un conjugué entre d'une part une molécule susceptible d'être reconnue par:

35 - les anticorps dirigés contre des acides gras à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, en C<sub>4</sub>-C<sub>22</sub>;

- les anticorps dirigés contre les isoprénoïdes en C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> liés à une cystéine; et/ou
- les anticorps dirigés contre le cholestérol et ses dérivés,

et, d'autre part, une molécule porteuse d'une taille suffisante pour permettre la reconnaissance de cette molécule par lesdits anticorps, telle que la polylysine, pour la  
5 préparation de médicaments destinés au traitement du SIDA.

On a aussi décrit un anticorps anti-choline glutaryl poly-L-lysine, mimant l'acétylcholine (Geffard et al., 1985 (11) ; Souan et al., 1986 (12)), des antisérums R-glutaraldéhyde-polylysine dans lesquels R est un composé indolealkylamine, dirigés contre les indolealkylamines (Geffard et al. 1985 (13)), des anticorps dirigés contre l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (Geffard et al., 1985 (14) ; Seguela et al., 1984 (15)) ainsi qu'un conjugué  
10 aspartate-polylysine utilisé dans la caractérisation immunochimique des anticorps polyclonaux anti-aspartate conjugué (Campistron et al., 1986 (21)).

Au cours des affections chroniques citées précédemment, des processus oxydatifs ont été trouvés et décrits (Buttke et al. 1994 (6)). C'est ainsi que dans la SEP, des auteurs ont  
15 montré une élévation directe des produits de lipopéroxydation (Hunter et al. 1985 (7), Korpela et al. 1989 (8)) et une diminution notable des anti-oxydants.

Les données récentes montrent qu'au cours de l'infection à VIH, le stress oxydatif serait l'un des éléments déterminants dans la mort cellulaire, donc la perte en lymphocytes TCD4<sup>+</sup> (Roederer et al. 1993 (9) ; Staal et al. 1992 (10)).

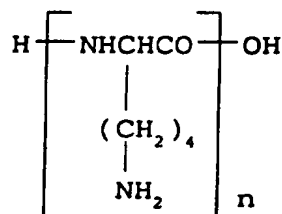
Il était donc indispensable de mettre à la disposition des malades des médicaments  
20 ayant le triple objectif suivant :

- restituer les perturbations antigéniques spécifiquement identifiées lors d'une affection humaine chronique ;
- lutter contre les processus inflammatoires, oxydatifs ;
- 25 - inhiber les agents étiologiques viraux et/ou bactériens pouvant être à l'origine des affections chroniques évolutives.

Le Demandeur a résolu ce problème en utilisant des conjugués monofonctionnels et/ou polyfonctionnels de la poly-L-lysine à visée thérapeutique.

Selon un premier aspect, la présente invention concerne donc l'utilisation d'au moins  
30 un conjugué monofonctionnel et/ou polyfonctionnel de la poly-L-lysine pour la préparation de compositions ou associations pharmaceutiques utiles dans le traitement de la dégénérescence neuronale, des neuropathies infectieuses, traumatiques ou toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmun, des troubles neurodégénératifs consécutifs à des affections génétiques et des affections prolifératives.

La poly-L-lysine (ci-après appelée polylysine) est un polypeptide ou homopolymère de la lysine dont la longueur de chaîne varie suivant la méthode de préparation. Elle répond à la formule :



- 5 (cf Merck Index, 10ème édition, abrégé N° 7444). Ce produit a un poids moléculaire moyen qui est généralement compris entre 2000 et 300 000, ce qui signifie que son degré de polymérisation (c'est à dire la valeur de l'indice n ci-dessus) est compris entre environ 15 et environ 2345. Bien entendu, par polylysine on entend de la polylysine linéaire ou ramifiée. Avantageusement, on utilise selon la présente invention de la polylysine linéaire possédant  
10 un poids moléculaire moyen compris entre 20 000 et 30 000.

Par conjugués monofonctionnels et polyfonctionnels de la polylysine, on entend respectivement les produits de couplage de l'une quelconque des molécules définies ci-après à la polylysine et les produits de couplage d'au moins deux molécules définies ci-après à au moins une molécule de polylysine. Par exemple, un conjugué bifonctionnel peut  
15 être représenté par la formule :

molécule 1 -- polylysine -- molécule 2

Avantageusement, les conjugués polyfonctionnels utilisés dans le cadre de l'invention sont des conjugués bifonctionnels.

20 Les molécules utilisées dans le cadre de l'invention, désignées sous le terme "d'haptène" dans les préparations ci-après, peuvent être choisies dans l'une des trois catégories suivantes :

1/ Les molécules à caractère "acide gras ou lipidique", qui comprennent :

- les acides gras mono- ou dicarboxyliques, ci-après communément désignés par le terme (di)acide gras, à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, comprenant généralement  
25 de 4 à 24 atomes de carbone ;
- les composés impliqués dans le mécanisme d'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, ces composés intervenant notamment dans le cycle du mévalonate, en particulier les isoprénoïdes liés à une cystéine ;
- le cholestérol et ses dérivés, notamment les hormones hydrophobes.

30 2/ Les molécules à caractère "anti-oxydant", qui comprennent :

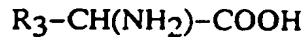
- la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou l'un de leurs dérivés ;
- la cystéine et ses dérivés, de formule :



dans laquelle  $R_1$  représente H ou  $CH_3$  et  $R_2$  représente un  $C_1-C_3$  alkylène.

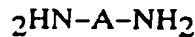
3/ Les molécules à caractère "acide aminé ou neurotransmetteur", qui comprennent :

- les indolealkylamines ;
- 5 - les catécholamines;
- les acides aminés de formule :



dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle, un groupe carboxyméthyle ou un groupe aminopropyle ;

- 10 - les acides amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfoniques ou sulfiniques;
- la carnitine ou la carnosine;
- les diamines de formule :



dans laquelle A représente un ( $C_1-C_6$ )alkylène ou un groupe  $-(CH_2)_m-NH-B-(CH_2)_p-$

- 15 dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe  $-(CH_2)_n-NH-$ , n étant un entier allant de 1 à 5 ;
- l'acétylcholine et
- l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

20 On distinguera donc trois sortes de conjugués (qu'ils soient monofonctionnels ou polyfonctionnels) : les conjugués "acide gras ou lipidiques"; les conjugués "anti-oxydants"; et les conjugués "acides aminés ou neurotransmetteurs".

Selon une variante de l'invention, on utilise au moins 4 conjugués monofonctionnels et/ou polyfonctionnels de la polylysine pour la préparation de compositions ou associations pharmaceutiques pour le traitement des troubles mentionnés précédemment. Il est possible  
25 de n'utiliser que des conjugués de la même sorte. Avantageusement, on utilise des conjugués de deux sortes différentes. De manière préférée, on utilise des conjugués de chacune des trois sortes ci-dessus.

Selon une autre variante de l'invention, il est possible d'utiliser également un ou deux anticorps monoclonaux anti-idiotypiques pour préparer les compositions ou associations  
30 pharmaceutiques mentionnées précédemment. Ces anticorps sont par exemple ceux décrits par Chagnaud et al. (18, 19, 20).

Généralement, le (di)acide gras comprend de 4 à 24 atomes de carbone, comme par exemple l'acide butyrique, maléique, succinique, glutarique, adipique, pimélique, subérique, sébasique, caproïque, caprylique, caprique, laurique, myristique, palmitique, palmitoléique,  
35 stéarique, oléique, linoléique,  $\gamma$ -linolénique,  $\alpha$ -linolénique, arachidique, gadoléique, arachidonique, béthénique, érucique, clupadonique ou azélaïque . De préférence, le

(di)acide gras est choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique ou l'acide azélaïque.

Les isoprénoides liés à une cystéine comprennent généralement de 6 à 20 atomes de carbone. Avantageusement, on utilise dans le cadre de l'invention le farnésyl-cystéine, le  
5 géranyl-géranyl-cystéine ou le mévalonate-cystéine.

Comme hormone hydrophobe, on utilise avantageusement la progestérone ou le 2-méthoxyoestradiol.

Comme dérivé de la cystéine, on utilise avantageusement l'homocystéine ou la méthionine.

10 Les indolealkyleamines et catécholamines utilisées dans le cadre de l'invention comprennent notamment le tryptophane, le 5-méthoxytryptophane, la sérotonine, la tryptamine, la 5-méthoxytryptamine, la mélatonine, la phénylalanine, la 3,4-dihydroxyphénylalanine et la tyrosine.

Comme acides aminés, on utilise de préférence l'histidine, la glycine, l'aspartate ou  
15 l'ornithine.

Les acides amino(C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)alkylsulfoniques ou sulfiniques utilisés selon l'invention incluent notamment la taurine, l'homotaurine et l'hypotaurine.

Les diamines utilisées de manière préférentielle dans le cadre de l'invention sont la putrescine, la cadavérine, la spermine et la spermidine.

20 Avantageusement, dans les conjugués monofonctionnels de la polylysine, la molécule utilisée est un (di)acide gras tel que défini précédemment. Dans les conjugués polyfonctionnels de la polylysine, au moins une des molécules utilisées est avantageusement un (di)acide gras, tel que défini précédemment, étant entendu que plusieurs (di)acides gras différents peuvent être utilisés. De préférence, ledit (di)acide gras  
25 est choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique ou l'acide azélaïque.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également les compléments alimentaires et vitaminés comprenant, à titre de principe actif, au moins un conjugué monofonctionnel et/ou polyfonctionnel de la polylysine définis ci-dessus, notamment au moins un conjugué  
30 entre un (di)acide gras et la polylysine.

Les méthodes de couplage entre lesdites molécules et la polylysine, pour l'obtention de ces conjugués sont les méthodes de couplage chimique classiques bien connues de l'homme du métier, entre un groupe fonctionnel de chaque molécule et un groupe fonctionnel de la polylysine. Ces couplages sont réalisés par l'intermédiaire d'un agent de  
35 couplage, choisi par exemple parmi le glutaraldéhyde, l'anhydride succinique ou glutarique, le carbodiimide, le chloroformiate d'éthyle, ou l'hexaméthylène diisocyanate. Des exemples

de telles méthodes de couplage sont notamment celles décrites dans Geffard et al. (16). On peut également coupler les molécules à la polylysine par simple adsorption. Des exemples de méthodes de couplage appropriées sont décrites en détail dans les préparations ci-après.

5 A titre illustratif, le couplage entre lesdites molécules et la polylysine peut être effectué entre une fonction amine de la polylysine et une fonction carboxylique desdites molécules.

10 Ainsi, dans le cas des acides gras, notamment l'acide myristique, l'acide palmitique, etc., ainsi que dans le cas des isoprénoïdes liés à une cystéine, notamment de la farnésyl-cystéine, la liaison avec la polylysine est effectuée entre une fonction amine de cette dernière et la fonction carboxylique des molécules susmentionnées.

De même, dans le cas de la cystéine et ses dérivés, la liaison avec la polylysine se fait avantageusement entre une fonction amine de cette dernière et la fonction acide de ces molécules.

15 Alternativement, la cystéine et ses dérivés peuvent être préalablement activés par couplage avec l'anhydride succinique ou glutarique, la liaison se faisant alors entre une fonction amine de la polylysine et la fonction acide libre de la molécule succinylée ou glutarylée. Ou bien encore, la cystéine et ses dérivés peuvent être liés à la polylysine par réaction avec le glutaraldéhyde, la réaction se faisant notamment comme décrit par Geffard et al. (17).

20 Dans le cas du cholestérol et de ses dérivés, le couplage avec la polylysine est avantageusement réalisé par l'intermédiaire du groupe hydroxyle du cholestérol.

Avantageusement le cholestérol et ses dérivés sont adsorbés sur la polylysine.

Dans le cas des hormones hydrophobes, le couplage avec la polylysine est avantageusement réalisé par l'hexaméthylène diisocyanate.

25 Dans le cas de la vitamine A (acide rétinoïque), la liaison entre cette molécule et la polylysine s'effectue entre la fonction amine de cette dernière et la fonction acide de la molécule.

30 Dans le cas de la vitamine C (acide ascorbique), la liaison entre cette molécule et la polylysine s'effectue entre la fonction amine de cette dernière et la fonction oxo de la molécule.

Dans le cas de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la liaison entre cette molécule et la polylysine s'effectue entre la fonction amine de cette dernière et la fonction acide libre du succinate acide de la molécule.

35 Dans le cas des acides aminoalkylsulfoniques ou sulfiniques, notamment la taurine, l'homotaurine et l'hypotaurine, la liaison entre ces molécules et la polylysine s'effectue par



activation préalable des molécules avec un anhydride d'acide (succinique ou glutarique), ou bien par couplage avec le glutaraldéhyde.

Dans le cas des acides aminés, de certains composés indolcalkylamines, notamment le tryptophane, et des catécholamines, on peut effectuer la liaison entre ces molécules et la polylysine soit directement, soit par couplage avec le carbodiimide, le glutaraldéhyde, un anhydride d'acide ou un chlorure d'acide, par exemple le chloroformiate d'éthyle.

Dans le cas des diamines, on peut effectuer la liaison entre ces molécules et la polylysine par couplage avec le glutaraldéhyde ou un anhydride d'acide. La liaison entre la carnitine ou la carnosine d'une part, et la polylysine d'autre part, s'effectue par couplage avec le carbodiimide.

Les conjugués selon l'invention sont utilisables notamment pour la préparation de compositions ou associations pharmaceutiques utiles dans le traitement de la dégénérescence neuronale, des neuropathies infectieuses, traumatiques et toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmunitaire, des troubles neurodégénératifs consécutifs à des affections génétiques et des affections prolifératives et plus particulièrement dans les indications suivantes : troubles de la mémoire, démence vasculaire, troubles post-encéphalitiques, troubles post-apoplectiques, syndromes post-traumatiques dus à un traumatisme crânien, troubles dérivant d'anoxies cérébrales, maladie d'Alzheimer, démence sénile, démence subcorticale telle que la chorée de Huntington et la maladie de Parkinson, démence provoquée par le SIDA, neuropathies dérivées de morbidité ou dommage des nerfs sympathiques ou sensoriels, maladies cérébrales telles que l'œdème cérébral, dégénérescences spinocérébelleuses, neuropathies consécutives à une maladie de Lyme, affections présentant des troubles neurodégénératifs telles que la maladie de Charcot-Marie Tooth, sclérose latérale amyotrophique, sclérose en plaques, épilepsies, migraines, polyarthrites, diabète insulino-dépendant, lupus érythémateux disséminé, thyroïdite de Hashimoto, maladie de Horton, dermatomyosite et polymyosite, ainsi que spondylarthrite ankylosante, infection à VIH et cancers.

L'invention concerne aussi une méthode de traitement de ces maladies à l'aide des conjugués de la polylysine définis précédemment.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par association pharmaceutique plusieurs mélanges de conjugués de la polylysine, conditionnés de manière distincte, qui peuvent être administrés simultanément ou séparément, par exemple de manière séquentielle. Ces mélanges se présentent dans des conditionnements distincts, identiques ou différents, en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention contiennent, à titre de principe actif, un mélange de conjugués de la polylysine tels que définis précédemment, en combinaison avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'administration des conjugués selon l'invention s'effectue préférentiellement par voie parentérale. La quantité de principe actif à administrer dans le traitement des troubles ci-dessus selon la méthode de la présente invention dépend bien évidemment de la nature et de la gravité des affections à traiter ainsi que du poids du malade. Néanmoins, les doses unitaires préférées comprendront généralement de 0,1 à 2 ml, de préférence de 0,5 à 1 ml, comme par exemple 0,6 ; 0,8 et 1 ml, de solution de conjugués, à raison de 0,3 à 0,6 mg de conjugués/ml. Ces doses unitaires seront normalement administrées 1 à 4 fois par jour, mais on peut également envisager une administration plus espacée dans le temps, par exemple tous les 2 à 3 jours.

Les conjugués selon l'invention peuvent se présenter sous forme de solutions aqueuses contenant les doses unitaires indiquées ci-dessus dans un véhicule aqueux, isotonique ou stérile qui contient éventuellement des agents de dispersion et/ou des mouillants pharmacologiquement compatibles. Ces solutions sont conditionnées de manière appropriée pour permettre une administration parentérale, par exemple une administration intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée, ou l'introduction dans un dispositif de perfusion intraveineuse, ou bien encore une administration par un système d'implant permettant la perfusion sous-cutanée.

On peut également administrer les conjugués selon l'invention par voie orale, intranasale, rectale ou bien percutanée. Dans ce cas, les formes unitaires d'administration sont préparées de manière conventionnelle selon les techniques classiques connues de l'homme du métier, avec les excipients couramment utilisés dans ce domaine.

A titre d'exemples de composition pharmaceutique selon l'invention, on peut mentionner : (les abréviations utilisées sont explicitées ci-après)

\* une composition qui comprend les conjugués suivants : L-DOPA-G-PL,  $\alpha$ -tocotrienol-PL, Ole-PL-Farcys, PO-PL-Ole, Myr-PL-Ole, Cys-AG-PL ou Cys-AS-PL, Homocys-AG-PL ou Homocys-AS-PL, Met-AG-PL ou Met-AS-PL, Met-G-PL, Cys-G-PL, Homocys-G-PL, Laur-PL-Ole, GABA-AG-PL, 5MT-AG-PL, His-PL, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac, Met-PL-Nac, utile notamment pour le traitement de la maladie de Parkinson.

\* une composition qui comprend les conjugués suivants : GABA-G-PL, PO-PL-Aze, Pal-PL-Farcys, Myr-PL-Farcys, W-AG-PL, Ole-PL-Pal, Myr-PL-Ole,  $\alpha$ -tocotrienol-PL, Aze-PL-Lin2, utile notamment pour le traitement des épilepsies.

\* une composition qui comprend les conjugués suivants : HW-AG-PL, W-AG-PL, MT-AG-PL,  $\alpha$ -tocotrienol-PL, Cys-AG-PL, Met-AG-PL, Homocys-AG-PL, utile notamment pour le traitement des migraines essentielles.

A titre d'exemples d'association pharmaceutique selon l'invention, on peut mentionner:

\* une association qui comprend dans deux conditionnements distincts, d'une part les conjugués suivants (1a) : Farcys-PL-Pal, Pal-PL-Myr, Farcys-PL-Myr, Lin2-PL-Ole, Met-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac, Farcys-PL-Ole, Met-AG-PL, Pal-PL-Ole, Myr-PL-Ole, Tau-AG-PL, VitC-PL, Tau-G-PL, Stea-PL-Farcys, ACh-AG-PL,  $\alpha$  toco-PL, Aze-PL-Ole ; et d'autre part les conjugués suivants (1b): Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Myr, Pal-PL-Myr, Aze-PL-Ole, Pal-PL-Ole, Farcys-PL-Ole, PO-PL-Aze, Ole-PL-Myr, Stea-PL-Farcys, Ole-PL-Laur, utile notamment pour le traitement des neuropathies post-Lyme et de la spondylarthrite ankylosante.

\* une association qui comprend dans deux conditionnements distincts, d'une part les conjugués suivants (2a) : Myr-PL-Pal, Pal-PL-Ole, Myr-PL-Ole, Tau-AS-PL ou Tau-AG-PL,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Homocys-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Met-PL-Nac, Farcys-PL-Myr, Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Ole, Farcys-PL-Stea, Met-AS-PL ou Met-AG-PL, Homocys-AS-PL ou Homocys-AG-PL, Cys-G-PL, Homocys-G-PL, Met-G-PL, CHO-PL, 5MT-AG-PL, W-AG-PL, ACh-AG-PL ; et d'autre part les conjugués suivants (2b) : Pal-PL-Ole, Tau-AS-PL ou Tau-AG-PL,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Homocys-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Met-PL-Nac, Farcys-PL-Myr, Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Ole, Farcys-PL-Stea, Met-AS-PL ou Met-AG-PL, Homocys-AS-PL ou Homocys-AG-PL, Cys-AG-PL, Cys-G-PL, Met-G-PL, Homocys-G-PL, Met-G-PL, CHO-PL, W-AG-PL, ACh-AG-PL, utile notamment pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique.

\* une association qui comprend dans trois conditionnements distincts :

3a) les conjugués suivants : Myr-PL-Pal, Pal-PL-Ole, Myr-PL-Ole, Tau-AS-PL ou Tau-AG-PL,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Homocys-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Met-PL-Nac, Farcys-PL-Myr, Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Ole, Farcys-PL-Stea, Met-AS-PL ou Met-AG-PL, Homocys-AS-PL ou Homocys-AG-PL, Cys-G-PL, Homocys-G-PL, Met-G-PL, CHO-PL, 5MT-AG-PL, W-AG-PL, ACh-AG-PL ;

3b) les conjugués suivants : Cys-AG-PL, Met-AG-PL, Homocys-G-PL, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac, Met-PL-Nac, Tau-AG-PL, Tau-G-PL, Met-G-PL,  $\alpha$ toco-PL,  $\alpha$ toco-PL-Ret ;

et 3c) les conjugués suivants : Farcys-PL-Ole, Aze-PL-Ole, Aze-PL-PO, Met-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac,  $\alpha$ toco-PL, Lin2-PL-Ole, Ret-PL, Ole-PL-Laur,  $\alpha$ toco-PL-Ret, Tau-G-PL, ACh-AG-PL, PRO-PL, GABA-G-PL, utile notamment pour le traitement de la chorée de Huntington.

\* une association qui comprend dans quatre conditionnements distincts :

4a) les conjugués suivants : Farcys-PL-Ole, PO-PL-Olc, Aze-PL-Ole, Aze-PL-PO, Met-PL-Nac, Homocys-PL-Nac,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Tau-AG-PL, Lin2-PL-Ole, CHO-PL, Ole-PL-Laur, 5-MT-AG-PL, Tau-G-PL, ACh-AG-PL ;

5 4b) les conjugués suivants : Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Myr, Pal-PL-Myr, Aze-PL-Ole, Pal-PL-Ole, Farcys-PL-Ole, PO-PL-Aze, Ole-PL-Myr, Stea-PL-Farcys, Ole-PL-Laur ;

4c) les conjugués suivants : Farcys-PL-Olc, Aze-PL-Olc, Aze-PL-PO, Met-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac,  $\alpha$ toco-PL, Lin2-PL-Ole, Ret-PL, Ole-PL-Laur,  $\alpha$ toco-PL-Ret, Tau-G-PL, ACh-AG-PL, PRO-PL, GABA-G-PL ;

10 et 4d) les conjugués suivants : Farcys-PL-Olc, Aze-PL-Olc, Aze-PL-PO,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Tau-AG-PL, Lin2-PL-Ole, CHO-PL, Laur-PL-Ole, utile notamment pour le traitement de la sclérose en plaques.

\* une association qui comprend dans trois conditionnements distincts :

15 5a) les conjugués suivants : Farcys-PL-Pal, Pal-PL-Myr, Farcys-PL-Myr, Lin2-PL-Ole, Met-PL-Nac, Cys-PL-Nac, Homocys-PL-Nac, Farcys-PL-Ole, Met-AG-PL, Pal-PL-Ole, Myr-PL-Ole, Tau-AG-PL, VitC-PL, Tau-G-PL, Stea-PL-Farcys, ACh-AG-PL,  $\alpha$ toco-PL, Aze-PL-Ole ;

20 5b) les conjugués suivants : Farcys-PL-Pal, Farcys-PL-Myr, Pal-PL-Myr, Aze-PL-Ole, Pal-PL-Ole, Farcys-PL-Ole, PO-PL-Aze, Ole-PL-Myr, Stea-PL-Farcys, Ole-PL-Laur ;

et 5c) les conjugués suivants : Farcys-PL-Pal, Pal-PL-Myr, Farcys-PL-Myr, Farcys-PL-Ole, Myr-PL-Olc, Stea-PL-Farcys, ACh-AG-PL,  $\alpha$ toco-PL, utile notamment pour le traitement des polyarthrites.

25 \* une association qui comprend dans deux conditionnements distincts, d'une part les conjugués suivants (6a) : Lin2-PL-Farcys, Stea-PL-Farcys, Myr-PL-Farcys, Pal-PL-Farcys, Ole-PL-Farcys, Cys-AG-PL, Met-AG-PL, Homocys-AG-PL, CHO-PL, Homocys-PL-Nac, Cys-PL-Nac,  $\alpha$ toco-PL-Ret,  $\alpha$ toco-PL, VitC-PL, Ole-PL-Laur, Met-G-PL, Met-PL-Nac, Homocys-PL-Nac, Cys-G-PL; et d'autre part les conjugués mentionnés au point 3c) ci-dessus, utile notamment pour le traitement de l'infection à VIH.

30 \* une association qui comprend dans trois conditionnements distincts :

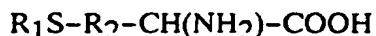
7a) les conjugués suivants : PRO-PL, Ret-PL,  $\alpha$ toco-PL,  $\alpha$ toco-PL-Ret, W-AG-PL, 5MT-AG-PL, Hist-PL;

7b) les conjugués mentionnés au point 1b) ci-dessus; et

35 7c) les conjugués suivants : L-DOPA-G-PL, L-DOPA-AG-PL, 5MT-AG-PL, HW-AG-PL, Tyr-AG-PL, utile notamment pour le traitement des cancers.

Selon un autre aspect, l'invention concerne également les conjugués monofonctionnels et polyfonctionnels entre d'une part la polylysine et d'autre part une (plusieurs) molécule(s) choisie(s) parmi :

- les (di)acides gras à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, comprenant  
5 généralement de 4 à 24 atomes de carbone ;
- les composés impliqués dans le mécanisme d'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, ces composés intervenant notamment dans le cycle du mévalonate, en particulier les isoprénoïdes liés à une cystéine ;
- le cholestérol et ses dérivés, notamment les hormones hydrophobes ;
- 10 – la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou un de leurs dérivés ;
- la cystéine et ses dérivés, de formule :



dans laquelle  $R_1$  représente H ou  $CH_3$  et  $R_2$  représente un  $C_1-C_3$  alkylène.

- les indolealkylamines ;
- 15 – les catécholamines ;
- les acides aminés de formule :



dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle, un groupe carboxyméthyle ou un groupe aminopropyle ;

- 20 – les acides amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfoniques ou sulfiniques ;
- la carnitine ou la carnosine ;
- les diamines de formule :



- dans laquelle A représente un ( $C_1-C_6$ )alkylène ou un groupe  $-(CH_2)_m-NH-B-(CH_2)_p-$   
25 dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe  $-(CH_2)_n-NH-$ , n étant un entier allant de 1 à 5 ;

- l'acétylcholine et
- l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

à la condition que lorsque le conjugué est monofonctionnel, la molécule est choisie parmi :

- 30 – une hormone hydrophobe ;
- la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou un de leurs dérivés ;
- un acide aminé de formule :



- dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle ou un groupe  
35 aminopropyle ;

- un acide amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfonique ou sulfinique ;

- la carnitine ou la carnosine; ou
- une diamine de formule :



5 dans laquelle A représente un (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkylène ou un groupe -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-B-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>- dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-, n étant un entier allant de 1 à 5 ;

Les préparations et exemples qui suivent illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

10 Les préparations illustrent la synthèse des conjugués, qui sont identifiés par l'agent de couplage utilisé, et les exemples sont relatifs aux compositions et associations pharmaceutiques de l'invention. Dans ceux-ci, les abréviations suivantes ont été utilisées :

- 5MT = 5-méthoxytryptamine ;
- ACh = acétylcholine ;
- AG = anhydride glutarique ;
- 15 AS = anhydride succinique ;
- G = glutaraldehyde réduit ;
- αtoco = α-tocophérol ;
- Aze = acide azélaïque ;
- CHO = cholestérol ;
- 20 Cys = cystéine ;
- DMF = diméthylformamide ;
- DMSO = diméthylsulfoxyde ;
- ECF = chloroformiate d'éthyle
- Farcys = farnésyl cystéine ;
- 25 GABA = acide γ-aminobutyrique ;
- His = histamine ;
- Hist = histidine ;
- Homocys = homocystéine ;
- HW = 5-hydroxytryptophane ;
- 30 Laur = acide laurique ;
- L-DOPA = L-3,4 dihydroxyphénylalanine ;
- Lin<sub>2</sub> = acide α-linoléique ;
- MBS = métabisulfite de sodium
- MES = acide morpholinoéthanol sulfonique
- 35 Met = méthionine ;
- Myr = acide myristique ;

Pal = acide palmitique ;

Nac = N-acétylé ;

Ret = acide rétinoïque ;

Ole = acide oléique ;

5 PO = acide palmitoléique ;

stea = acide stéarique ;

tau = taurine ;

TEA = tétraéthylamine ;

vitc = acide ascorbique ;

10 W = tryptophane ;

PRO = progestérone ;

2MO = 2-méthoxyoestradiol ;

AI = anticorps monoclonal anti-idiotypique

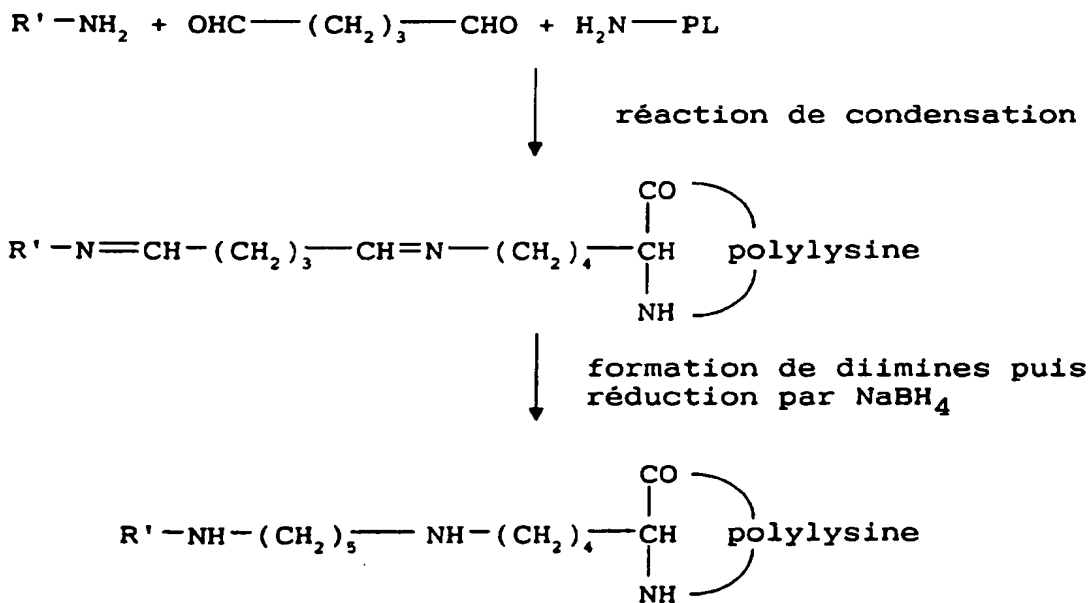
PL = polylysine.

15

### Préparations

#### I. Conjugués glutaraldéhyde :

20 Cette préparation illustre notamment la préparation des conjugués de cystéine ou de ses dérivés avec la polylysine selon le schéma réactionnel ci-après :



(R' = cystéinyl, homocystéinyl, méthionyl).

20 mg d'haptène sont repris dans 1 ml de tampon acétate 1,5 M (pH8) avec 1  $\mu$ l de traceur radioactif ( $^3\text{H}$  tyrosine : ref. NET 127, Dupont de Nemours). Dans le cas de conjugués catécholaminergiques, il faut rajouter quelques grains de MBS. Dans le cas du tryptophane, il faut solubiliser ce dernier dans 1 ml de DMSO (Prolabo) et 1 ml d'acétate de sodium (Prolabo).

Séparément, 40 mg de polylysine sont repris dans 2 ml de tampon acétate 1,5 M.

A la solution d'haptène, on ajoute 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde (Prolabo) à 5 %, et environ 10 secondes après, la polylysine. La réaction de couplage se traduit par une coloration jaune ; dès que celle-ci est atteinte, la réaction est stoppée par addition de quelques gouttes d'une solution de  $\text{NaBH}_4$  (Aldrich) (quelques grains dans de l'eau, de manière à avoir une solution qui "bulle").

Dans le cas particulier de la taurine, il faut rajouter 1 ml de glutaraldéhyde à 1 % seulement.

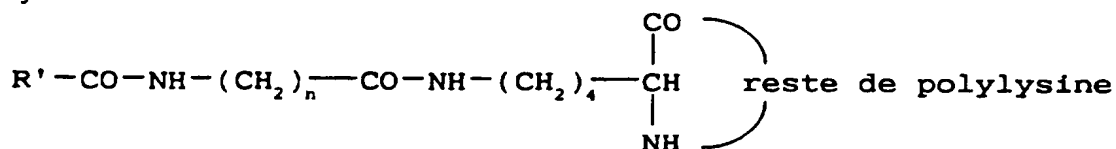
Les conjugués sont purifiés par dialyse contre de l'eau, sauf pour les catécholamines, où il faut rajouter du MBS à la solution de dialyse.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-G-PL (R = haptène, G = résidu glutaraldéhyde réduit).

## II. Conjugués avec un bras succinyl ou glutaryl

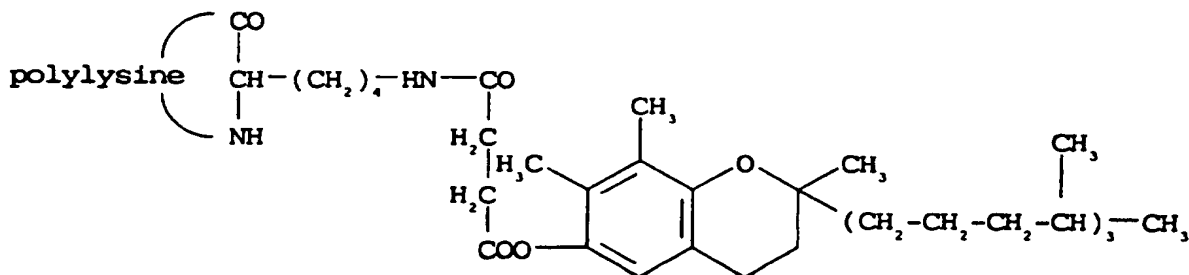
C'est le cas par exemple de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), de la cystéine et ses dérivés, ou bien encore de la 5-méthoxytryptamine, de la taurine, de l'homotaurine :

\* Cys-AS ou AG-PL



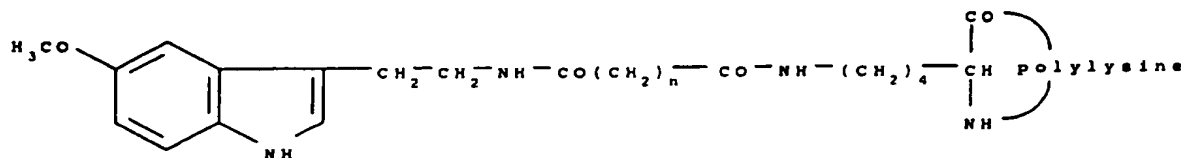
R' = cystéinyl, homocystéinyl, méthionyl, avec n = 2 dans le cas de l'acide ou anhydride succinique, n = 3 dans le cas de l'acide ou anhydride glutarique.

\*  $\alpha$ toco-AS-PL



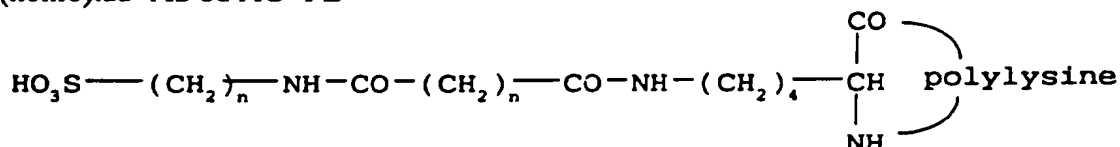


## \* 5MT-AS ou AG-PL



n = 2 ou 3

## \* (homo)tau-AS ou AG-PL



n = 2, 3

40 mg d'haptène sont solubilisés dans 1 ml d'eau avec 1  $\mu$ l de traceur radioactif ( $^3$ H tyrosine). Dans le cas de la 5-méthoxytryptamine, sa solubilisation n'est possible qu'en mettant 200  $\mu$ l de DMSO. On ajoute 34 mg d'anhydride glutarique ou succinique (Sigma) et aussitôt 340  $\mu$ l de NaOH 1M (Prolabo) de manière à être à pH 7. Les conjugués sont ensuite lyophilisés.

L'accrochage de ces conjugués sur la polylysine se fait par le chloroformiate d'éthyle (Fluka) à 4° C. Les haptènes -glutaryl ou -succinyl sont repris dans 1,6 ml de DMF anhydre (Prolabo) et 20  $\mu$ l de TEA anhydre (Merck) (pas de solubilisation complète). L'activation des COOH se fait par 400  $\mu$ l d'ECF dilué au 1/16 dans du DMF anhydre pendant 5 minutes. Puis, on ajoute une solution de PL (80 mg dissouts dans 2 ml d'eau et 20  $\mu$ l de TEA anhydre).

La purification des conjugués est faite par dialyse contre de l'eau.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-AS ou AG-PL (R = haptène, AS = résidu succinyl, AG = résidu glutaryl).

**III. Conjugués carbodiimide**

50 mg d'haptène et 50 mg de polylysine sont solubilisés dans 1 ml de tampon MES 0,2 M pH 5,4.

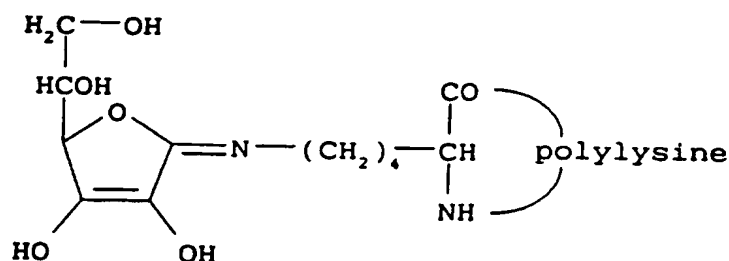
On ajoute petit à petit, à cette solution, 200 mg de carbodiimide (Sigma) en environ 10 minutes. Il faut vérifier à chaque addition le pH, et l'ajuster à 5,4.

La purification des conjugués est faite par dialyse contre de l'eau.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL (R = haptène lié par -CO-NH-).

#### IV. Conjugués chloroformiate d'éthyle (molécules hydrophiles)

\* VitC-PL :



5 40 mg d'haptène sont repris dans 1,6 ml de DMF anhydre et 20  $\mu$ l de TEA anhydre. L'activation des COOH se fait par 400  $\mu$ l d'ECF dilué au 1/16 dans du DMF anhydre pendant 5 minutes. Au bout de ce temps, on ajoute une solution de PL (80 mg dissouts dans 2 ml d'eau et 20  $\mu$ l de TEA anhydre).

\* Cystéine, homocystéine, méthionine :

10 40 mg d'haptène sont repris dans 2 ml de méthanol anhydre et 20  $\mu$ l de TEA anhydre (solubilisation difficile). L'activation des COOH se fait avec 1 ml d'ECF dilué au 1/16 dans du DMF anhydre pendant 5 minutes. Au bout de 5 minutes, on ajoute une solution de PL (80 mg dissout dans 2 ml d'eau et 20  $\mu$ l de TEA anhydre).

\* carnitine :

15 On s'assure de la bonne déshydratation de la carnitine en la lyophilisant. Le couplage doit se faire ensuite très rapidement, car la carnitine est très hygroscopique. Le protocole est le même que pour la vitamine C.

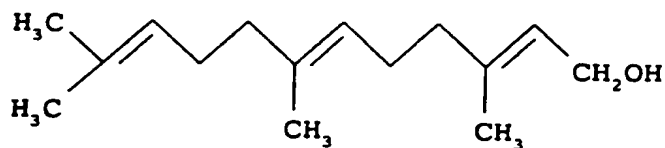
La purification des conjugués est faite par dialyse contre de l'eau.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL (R = haptène).

20 **V. Conjugués chloroformiate d'éthyle (acides gras, farnesyl cystéine, acide rétinolique et  $\alpha$ -tocophérol)**

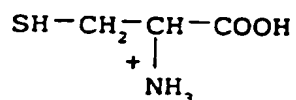
\* Cas de la farnesyl cystéine :

La farnésyl cystéine est le résultat de la condensation du farnésol :

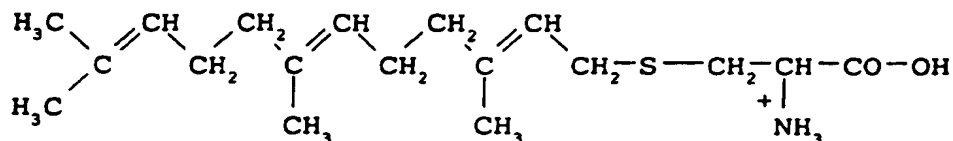


25

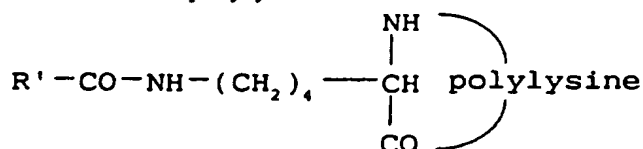
avec la cystéine :



par liaison thioéther.



5 Cette molécule est ensuite liée à la polylysine :



(R' = résidu de farnésylcystéine)

On utilise 20 mg d'haptène pour les acides gras (40 mg pour l'acide azélaïque), 40 mg pour la farnésylcystéine, 40 mg pour l'acide rétinique ou 60 mg pour l' $\alpha$ -tocophérol. Les haptènes sont solubilisés dans 1 ml de méthanol anhydre et 20  $\mu$ l de TEA anhydre avec 1  $\mu$ l de marqueur radioactif (acide palmitique  $^{14}\text{C}$  : réf. C14 NECQ, Dupont de Nemours). Puis on laisse le mélange sous atmosphère sèche pendant 30 minutes.

On active ensuite ce mélange par 200  $\mu$ l de chloroformiate d'éthyle dilués au 1/16 dans du DMF anhydre, pendant 15 minutes à 4° C. Puis on rajoute la solution de PL (80 mg dans 4 ml de tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$  contenant  $\text{CaCl}_2$   $10^{-3}\text{M}$  et 40  $\mu$ l de TEA anhydre).

La réaction terminée, le conjugué est purifié par dialyse. On transfère les solutions obtenues dans des tubes de dialyse (Tube dialyse Visking, Prolabo), dont les pores laissent passer les molécules non couplées ( $\text{PM} < 12$  à 14 000 Da). Pour éliminer le maximum de molécules non couplées, la 1ère solution de dialyse comprend : 1/3 de DMF, 1/3 de méthanol, 1/3 de tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$  avec du  $\text{CaCl}_2$  à  $10^{-3}\text{M}$ . Deux autres dialyses sont faites, avec une solution de tampon phosphate  $10^{-2}\text{M}$  contenant du  $\text{CaCl}_2$   $10^{-3}\text{M}$ , pendant 24h. Le rôle du  $\text{CaCl}_2$  est de rendre les conjugués plus solubles par interaction des ions  $\text{Ca}^{2+}$  avec les chaînes aliphatiques. Mais ce tampon peut être remplacé par un tampon guanidine 10 mM pH7.

25 Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL (R = haptène).

#### VI. Acétylation des conjugués farnésylcystéine ou thiols couplés par la carbodiimide

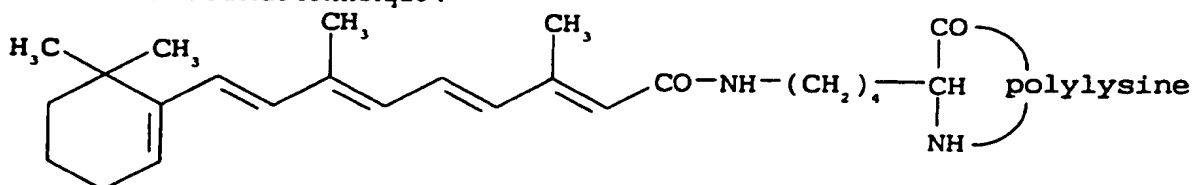
Le pH des conjugués est ramené à 10 avec de la soude 1M. Puis on ajoute un mélange de 4  $\mu$ l d'anhydride acétique (Prolabo) et de 500  $\mu$ l de DMSO anhydre. L'addition de 40  $\mu$ l de NaOH 1M permet de neutraliser la réaction.

Les conjugués sont ensuite dialysés contre de l'eau.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL-Nac (R = haptène, Nac = N-acétylé).

#### VII. Conjugués cholestérol ou acide rétinoïque par adsorption

\* Cas de l'acide rétinoïque :



5

40 mg d'haptène sont solubilisés avec 2 ml de méthanol anhydre et 2 ml de DMF anhydre avec 1  $\mu$ l de traceur radioactif (cholesterol : réf. NET 725, Dupont de Nemours). Puis on ajoute goutte à goutte 80 mg de PL dissouts dans 2 ml de tampon acétate 1,5 M. On agite bien puis on purifie les conjugués par dialyse. La première solution de dialyse est constituée d'un mélange 1/3 méthanol, 1/3 DMF et 1/3 eau. Les deux solutions suivantes comprennent uniquement de l'eau.

10

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL (R = haptène).

#### VIII. Conjugués hexaméthylène diisocyanate

5 mg de 2-méthoxyoestradiol sont repris dans 1 ml de DMSO avec 1  $\mu$ l d'hormone radioactive (progestérone : réf. N381, Dupont de Nemours). On ajoute 10 mg de PL dissouts dans 1 ml de tampon phosphate 0,2 M pH10, et 50  $\mu$ l d'hexaméthylène diisocyanate (Fluka). On ajuste le pH à 10 avec de la soude 1N.

15

Pour la progestérone, le protocole est le même, mais on part de 40 mg de progestérone, 80 mg de PL et 200  $\mu$ l d'hexaméthylène diisocyanate.

20

La purification des conjugués se fait par dialyse, la 1ère solution est constituée d'un mélange DMF/DMSO/eau, les deux suivantes d'eau.

Les conjugués ainsi obtenus sont désignés par : R-PL (R = haptène).

De manière générale, le petit matériel dans lequel se font les réactions de couplage et les purifications des conjugués hydrophobes, est délipidé par rinçage au méthanol et séchage pour éviter toute contamination lipidique extérieure. De plus, dans la synthèse des conjugués ayant un haptène possédant une fonction thiol (cystéine, homocystéine, méthionine, etc.), on ajoute après la dialyse quelques grains de l'haptène correspondant non couplé.

25

30

Dans les exemples qui suivent, les conjugués de la polylysine ont été synthétisés suivant le mode opératoire décrit précédemment, en utilisant de la polylysine commercialisée par le société Sigma sous la référence P 7890. A titre d'indication, les

rapports de couplage des conjugués utilisés dans les exemples sont rapportés dans le Tableau suivant :

$\alpha$ toco-PL	23	Azc-PL-Lin2	10,10
Pro-PL	8	Farcys-PL-PO	30,30
Farcys-PL-Pal	8,8	Pal-PL-Myr	25,25
CHO-PL	33	Homocys-PL	4
Ole-PL-Pal	5,5	GABA-AG-PL	23
$\alpha$ toco-PL-Ret	22,23	L-DOPA-AG-PL	18
Ret-PL	11	Homocys-AG-PL	22
Ole-PL-Laur	7,5	Homocys-G-PL	5
Tau-AG-PL	32	Cys-G-PL	5
Tau-G-PL	44	Mct-G-PL	12
His-G-PL	5	Homocys-G-PL	4
Cys-AG-PL	10	Cys-PL-Nac	3
HW-AG-PL	41	Mct-PL-Nac	7
W-AG-PL	32	2MO-PL	22
Cys-PL-Nac	2	PRO-PL	12
Homocys-PL-Nac	3	GABA-G-PL	10
L-DOPA-G-PL	4	Azc-PL-Farcys	10,10

- 5 Par rapport de couplage, on entend le nombre de molécules d'haptène(s) conjuguées par molécule de polylysine. Dans le cas des conjugués bifonctionnels, on indique, pour chaque haptène, le nombre respectif de molécules conjuguées.

**Exemple 1** : Préparation d'une association pharmaceutique pour le traitement des troubles neurologiques consécutifs à une maladie de Lyme

- 10 De nombreuses affections neurologiques sont la conséquence d'infections bactériennes et virales connues ou non. *Borrelia burgdorferi*, est l'agent étiologique de la maladie de Lyme. Il provoque dans un certain nombre de cas des neuropathies.

On a préparé les solutions suivantes :

Solution 1		Solution 2	
Farcys-PL-Pal	1	Farcys-PL-Pal	1
Pal-PL-Myr	1	Farcys-PL-Myr	1
Farcys-PL-Myr	1	Pal-PL-Myr	1
Lin2-PL-Ole	1	Azc-PL-Ole	1
Met-PL-Nac	1	Pal-PL-Ole	1
Cys-PL-Nac	1	Farcys-PL-Ole	1
Homocys-PL-Nac	1	PO-PL-Aze	1
Farcys-PL-Ole	1	Ole-PL-Myr	1
Met-AG-PL	1	Stea-PL-Farcys	1
Pal-PL-Ole	1	Ole-PL-Laur	1
Myr-PL-Ole	1		
Tau-AG-PL	2		
VitC-PL	2		
Tau-G-PL	2		
Stea-PL-Farcys	2		
ACh-AG-PL	2		
$\alpha$ toco-PL	2		
Aze-PL-Ole	2		

Le chiffre à droite du conjugué monofonctionnel ou bifonctionnel de la polylysine indique la concentration en haptène(s) dudit conjugué dans la solution, étant entendu que la valeur 1 correspond à une concentration égale à  $10^{-5}$  M. Ainsi, pour le conjugué bifonctionnel Farcys-PL-Pal, on a :

$$[\text{Farcys}] = 10^{-5}\text{M}$$

$$[\text{Pal}] = 10^{-5}\text{M}.$$

De cette manière, on peut déterminer la concentration finale de chaque haptène dans les solution 1 et 2. Par exemple, la concentration finale en Farcys dans la solution 1 est de  $5.10^{-5}\text{M}$ .

#### Procédé de préparation :

On mélange les différentes solutions de conjugués monofonctionnels et bifonctionnels, préparées extemporanément dans du sérum physiologique, de manière à obtenir, après mélange au vortex et dilution dans les solutions finales respectives 1 et 2, les concentrations en haptènes indiquées précédemment. Puis, les solutions sont filtrées séparément sur des filtres Sartorius stériles ayant des pores de  $0,22\ \mu\text{m}$  puis réparties dans

des flacons stériles distincts ou préparées en solutions buvables distinctes (mélange sirop, huile végétale pure 1ère pression).

Les solutions 1 et 2 sont administrées alternativement par injection intramusculaire ou sous-cutanée lente, à raison de 1 ml de chaque solution 1 à 2 fois par jour, par exemple 2 fois la solution 2 pour 1 fois la solution 1 chaque jour.

On constate chez tous les malades (n = 4) traités selon le protocole décrit ci-dessus, une régression de la neuropathie causée par la maladie de Lyme.

**Exemple 2 :** Préparation d'une association pharmaceutique pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), encore appelée maladie de Charcot, est une affection progressive qui fait partie de la triade des affections dégénératives du système nerveux âgé, les deux autres étant les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Toutes les trois sont caractérisées par une vulnérabilité sélective d'un groupe de neurones disparaissant pour des raisons non encore connues. En effet, les lésions ne sont causées ni par des problèmes vasculaires, ni par des réactions inflammatoires. Dans la SLA, les cellules atteintes sont les motoneurones de la corne antérieure de la moëlle épinière et des noyaux moteurs crâniens : V, VII, IX, XI, XII ; et, les voies motrices (corticospinales et corticobulbaires) qui, dans leur ensemble peuvent être touchées, entraînant secondairement une amyotrophie. L'évolution se fait vers une aggravation progressive, avec installation d'un état grabataire, d'une insuffisance respiratoire par atteinte de la musculature intercostale et diaphragmatique menant rapidement au décès (24 à 26 mois en moyenne dans la majorité des cas). La SLA survient chez l'adulte, homme et femme, entre 40 et 60 ans (on constate 2000 nouveaux cas par an en France). L'incidence de la SLA est égale à celle de la sclérose en plaques (SEP) et est cinq fois supérieure à celle de la maladie de Huntington.

L'étiologie de cette affection demeure encore inconnue. Le modèle qui prévaut aujourd'hui est multifactoriel. Elle résulterait de l'addition combinée d'une susceptibilité génétique (5 à 10 % des cas de SLA familiales seraient rattachés à une transmission autosomale localisée sur le chromosome 21), d'un vieillissement accéléré et de facteurs neurotoxiques exogènes et/ou endogènes aboutissant à la destruction sélective des motoneurones.

On a préparé les solutions suivantes :

Solution 3		Solution 4	
Myr-PL-Pal	1	Pal-PL-Ole	1
Pal-PL-Ole	1	Tau-AS-PL ou	
Myr-PL-Ole	1	Tau-AG-PL	1
Tau-AS-PL ou		$\alpha$ toco-PL	3
Tau-AG-PL	1	VitC-PL	1
$\alpha$ toco-PL	3	Homocys-PL-Nac	4
VitC-PL	1	Cys-PL-Nac	4
Homocys-PL-Nac	4	Met-PL-Nac	4
Cys-PL-Nac	4	Farcys-PL-Myr	1
Met-PL-Nac	4	Farcys-PL-Pal	1
Farcys-PL-Myr	1	Farcys-PL-Ole	1
Farcys-PL-Pal	1	Farcys-PL-Stea	1
Farcys-PL-Ole	1	Met-AS-PL ou	
Farcys-PL-Stea	1	Met-AG-PL	4
Met-AS-PL ou		Homocys-AS-PL ou	
Met-AG-PL	4	Homocys-AG-PL	4
Homocys-AS-PL ou		Cys-AG-PL	4
Homocys-AG-PL	4	Cys-G-PL	4
Cys-G-PL	4	Met-G-PL	4
Homocys-G-PL	4	Homocys-G-PL	4
Met-G-PL	4	Met-G-PL	4
CHO-PL	1	CHO-PL	1
SMT-AG-PL	1	W-AG-PL	2
W-AG-PL	2	ACh-AG-PL	4
ACh-AG-PL	4	Al = 0,1 mg/ml	

Procédé de préparation : comme pour l'exemple 1.

Les solution 3 et 4 sont administrées par injection sous-cutanée lente, à raison de 0,8 ml de chaque solution 2 fois par jour, ou bien 0,8 ml de solution par jour en alternant les solutions 3 et 4 un jour sur deux.

On observe dans 80 % des cas (n = 30) une stabilisation de la symptomatologie ; dans 40 à 50 % des cas, une amélioration de la symptomatologie est même constatée (régression des atteintes).



**Exemple 3** : Préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement de la maladie de Parkinson

C'est une affection dégénérative du système nerveux central dans laquelle les neurones dopaminergiques de la voie nigro striée sont sélectivement détruits.

5 La maladie de Parkinson est l'aboutissement d'un processus chronique actif débutant 20 à 30 ans avant l'expression de la maladie, dont l'origine selon les hypothèses récentes est d'ordre multifactoriel. Elle est le résultat de l'action combinée d'une susceptibilité génétique, du vieillissement, et de facteurs neurotoxiques exogènes et endogènes aboutissant à la destruction des systèmes monoaminergiques ascendants. L'analyse post-mortem de sujets  
10 atteints de la forme idiopathique ou post-encéphalitique, met en évidence les phénomènes essentiels suivants :

(i) une dégénérescence du faisceau nigrostrié se traduit par l'effondrement des taux de dopamine (DA) et de ses métabolites dans le néostriatum et par une perte neuronale prédominante dans la pars compacta de la substance noire ;

15 (ii) une déficience en DA dans les neurones de l'aire tegmento-ventrale (ATV) qui sont à l'origine de la voie mésocorticolimbique et qui projettent sur le noyau accumbens. Une diminution moins importante du nombre de neurones DA et des corps de Lewy est observée dans la partie ventrale de l'ATV. La déplétion en DA doit atteindre un certain seuil critique (60 % à 80 %) avant que les symptômes parkinsoniens n'apparaissent. L'akinésie  
20 étant le symptôme principal relié au degré de déplétion en DA ;

(iii) la disparition en neurones nigriques s'accompagne de la libération du pigment mélanique et surtout de l'apparition de corps de Lewy, leur présence est un indicateur habituel de cette atteinte neuronale spécifique.

Au niveau évolutif et individuel, la maladie de Parkinson résulterait de l'intervention  
25 de ces différents facteurs, tôt dans la vie, chez des sujets possédant une susceptibilité génétique s'exprimant par exemple dans leur capacité anti-oxydative (glutathion réductase, phénotype d'hydroxylation...) conduisant à la réduction du pool neuronal nigrique. La perte neuronale physiologique liée à l'âge aboutirait ensuite à l'expression clinique de la maladie lorsque 80 % des neurones dopaminergiques nigriques manquent.

30 On a préparé la solution suivante :

**Solution 5**

	L-DOPA-G-PL	5
	$\alpha$ toco-PL	2
35	Ole-PL-Farcys	1
	PO-PL-Ole	1

	Myr-PL-Ole	1
	Cys-AG-PL ou	
	Cys-AS-PL	1
	Homocys-AG-PL ou	
5	Homocys-AS-PL	1
	Met-AG-PL ou	
	Met-AS-PL	1
	Met-G-PL	1
	Cys-G-PL	1
10	Homocys-G-PL	1
	Laur-PL-Ole	1
	GABA-AG-PL	2
	5MT-AG-PL	1
	Hist-PL	1
15	Cys-PL-Nac	1
	Homocys-PL-Nac	1
	Met-PL-Nac	1

**Préparation** : comme pour l'exemple 1.

20 La solution 5 est administrée par injection sous-cutanée, à raison de 0,4 à 0,8 ml de solution tous les 2 à 3 jours.

On constate une amélioration de la rigidité, de l'akinésie et des tremblements dans 80 % des cas (n = 15), avec une diminution de la prise d'autres traitements.

25 **Exemple 4** : Préparation d'une association pharmaceutique pour le traitement de la chorée de Huntington

On a préparé les solutions suivantes :

Solution 6		Solution 7	
Myr-PL-Pal	1	Cys-AG-PL	4
Pal-PL-Ole	1	Met-AG-PL	4
Myr-PL-Ole	1	Homocys-G-PL	4
Tau-AS-PL ou		Cys-PL-Nac	4
Tau-AG-PL	1	Homocys-PL-Nac	4
$\alpha$ toco-PL	3	Met-PL-Nac	4
VitC-PL	1	Tau-AG-PL	1
Homocys-PL-Nac	4	Tau-G-PL	1
Cys-PL-Nac	4	Met-G-PL	4
Met-PL-Nac	4	$\alpha$ toco-PL	2
Farcys-PL-Myr	1	$\alpha$ toco-PL-Ret	2
Farcys-PL-Pal	1		
Farcys-PL-Ole	1		
Farcys-PL-Stea	1		
Met-AS-PL ou			
Met-AG-PL	4		
Homocys-AS-PL ou			
Homocys-AG-PL	4		
Cys-G-PL	4		
Homocys-G-PL	4		
Met-G-PL	4		
CHO-PL	1		
5MT-AG-PL	1		
W-AG-PL	2		
ACh-AG-PL	4		

Solution 8	
Farcys-PL-Ole	2
Aze-PL-Ole	1
Aze-PL-PO	1
Met-PL-Nac	2
Cys-PL-Nac	2
Homocys-PL-Nac	2
$\alpha$ toco-PL	2
Lin2-PL-Ole	2
Ret-PL	1
Ole-PL-Laur	1
$\alpha$ toco-PL-Ret	1
Tau-G-PL	1
ACh-AG-PL	1
PRO-PL	1
GABA-G-PL	1

Préparation : comme pour l'exemple 1.

Les solution 6, 7 et 8 sont administrées par injection sous-cutanée :

- 5       – soit à raison de 0,6 ml de chaque solution tous les jours ;
- soit alternativement à raison de 0,6 ml d'une solution donnée tous les deux à trois jours (par exemple, on peut administrer la solution 6 le premier jour, la solution 7 le deuxième jour et la solution 8 le troisième jour, etc... ou bien encore on peut administrer la solution 6 le premier jour, la solution 7 le troisième jour et la solution 8 le cinquième jour, etc...).
- 10

Sur cinq patients en cours de traitement, on constate une nette amélioration au niveau de la récupération des fonctions mnésiques et de la vivacité relationnelle.

Exemple 5 : Préparation d'une association pharmaceutique pour le traitement de la

15   sclérose en plaques

En France, plus de 50 000 personnes sont atteintes de sclérose en plaques (SEP), et au moins 2000 nouveaux cas sont enregistrés chaque année. Cette affection débute chez le sujet jeune, habituellement entre 20 et 40 ans. Son incidence est 2 à 3 fois plus forte chez les femmes que chez les hommes. Les symptômes sont variables. Ils peuvent se présenter sous

20   forme : de troubles visuels, d'une faiblesse musculaire, d'une perte de coordination des

mouvements ou de contractures... Ils reflètent tous une altération de la conduction nerveuse centrale. Ils peuvent disparaître ou s'atténuer pour réapparaître ensuite sous une forme plus grave. L'évolution habituelle de la maladie est cyclique, entraînant une invalidité progressive, mais les formes cliniques sont très polymorphes. C'est une maladie invalidante dont le coût en suivi clinique, traitement symptomatique et prise en charge sont très élevés.

La SEP est une affection multifactorielle dans laquelle interviennent des facteurs liés à : l'environnement, une prédisposition génétique, et des désordres immunologiques. Le modèle qui prévaut se résume ainsi : un sujet prédisposé (grande fréquence des antigènes du système HLA : A3, B7, DR2DW2, DQB1 et DR4) rencontre un facteur exogène, vraisemblablement viral et/ou bactérien. Suit une longue phase de latence totalement silencieuse, au terme de laquelle se développent des réactions, pour une part autoimmunes, dirigées contre la myéline et la cellule productrice, l'oligodendrocyte. Ces désordres se traduisent par des lésions démyélinisantes du système nerveux central (SNC). La multiplicité des facteurs intervenant dans la SEP, et leur complexité, constituent des obstacles à la compréhension de son étiologie. C'est pourquoi, malgré les nombreux travaux effectués, celle-ci demeure toujours inconnue.

Les solutions suivantes ont été préparées :

Solution 9		Solution 10	
Farcys-PL-Ole	2	Farcys-PL-Pal	1
PO-PL-Ole	2	Farcys-PL-Myr	1
Aze-PL-Ole	2	Pal-PL-Myr	1
Aze-PL-PO	2	Aze-PL-Ole	1
Met-PL-Nac	2	Pal-PL-Ole	1
Homocys-PL-Nac	2	Farcys-PL-Ole	1
otoco-PL	2	PO-PL-Aze	1
VitC-PL	1	Ole-PL-Myr	1
Tau-AG-PL	2	Stea-PL-Farcys	1
Lin2-PL-Ole	2	Ole-PL-Laur	1
CHO-PL	1		
Ole-PL-Laur	1		
SMT-AG-PL	1		
Tau-G-PL	2		
ACh-AG-PL	2		

Solution 11		Solution 12	
Farcys-PL-Ole	2	Farcys-PL-Ole	2
Aze-PL-Ole	1	Aze-PL-Ole	1
Aze-PL-PO	1	Aze-PL-PO	1
Met-PL-Nac	2	$\alpha$ toco-PL	2
Cys-PL-Nac	2	VitC-PL	1
Homocys-PL-Nac	2	Tau-AG-PL	2
$\alpha$ toco-PL	2	Lin2-PL-Ole	2
Lin2-PL-Ole	2	CHO-PL	1
Ret-PL	1	Laur-PL-Ole	1
Ole-PL-Laur	1	AI = 0,1 mg/ml	
$\alpha$ toco-PL-Ret	1		
Tau-G-PL	1		
ACh-AG-PL	1		
PRO-PL	1		
GABA-G-PL	1		

**Préparation** : comme pour l'exemple 1.

5 Selon la forme clinique de la sclérose en plaques (SEP), l'administration (par injection sous-cutanée) des solutions 9, 10, 11 et 12 varie.

10 a) Dans le cas d'une poussée ou aggravation de la SEP, on utilise alternativement au moins deux des solutions 9, 10 ou 11, à raison de 0,5 ml à 1 ml de ces solutions une à deux fois par jour, ou bien de 0,5 ml à 1 ml de ces solutions tous les 2-3 jours, ou une fois par semaine. Par exemple, du 1er au 8ème jour de traitement, on administre alternativement, une ou deux fois par jour, les solutions 9 et 10. Du 8ème au 10ème jour de traitement, on administre alternativement, une fois par jour, les solutions 9 et 11. Du 10ème au 20ème jour de traitement, on administre alternativement, tous les deux jours, les solutions 9 et 11. Puis, après le 20ème jour de traitement, on utilise en alternance les solutions 9, 10 et 11 tous les 2-3 jours après le début du traitement.

15 Sur tous les cas (n = 15) de SEP en poussée en aggravation traités selon le protocole ci-dessus depuis juin 1994, on a observé 100 % de régression de la symptomatologie.

b) Dans le cas de la maladie chronique ou de la récupération des séquelles, on administre alternativement, à raison de 0,5 ml à 0,8 ml par jour les solutions 9, 11 et 12. Par exemple, on administre une solution par jour, le matin ou le soir.

On note dans 80 % des cas (n = 250) traités une régression significative de la symptomatologie.

5 **Exemple 6** : Préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement des épilepsies

Les épilepsies essentielles peuvent revêtir différentes formes cliniques et atteintes électro-encéphalographiques, allant des absences au grand mal épileptique.

On a préparé la solution suivante :

Solution 13

GABA-G-PL	4
PO-PL-Aze	2
Pal-PL-Farcys	1
Myr-PL-Farcys	1
W-AG-PL	1
Ole-PL-Pal	1
Myr-PL-Ole	1
$\alpha$ toco-PL	2
Aze-PL-Lin2	2

10

**Préparation** : comme pour l'exemple 1.

La solution **13** est administrée par injection sous-cutanée, à raison de 0,6 ml de solution 2 à 3 fois par semaine.

15 Les deux malades traités ont diminué leurs médications classiques (Zarontin®, Dépamide®,....) sans inconvénient majeur.

**Exemple 7** : Préparation d'une composition pharmaceutique pour le traitement des migraines essentielles

20 Celles-ci n'ont pas de cause apparente. Elles se présentent avec ou sans aura. Elles sont liées à un réflexe vasogénique impliquant la sérotonine et ses dérivés.

On a préparé la solution suivante

Solution 14 :

HW-AG-PL	3
25 W-AG-PL	3
5MT-AG-PL	3

αtoco-PL	2
Cys-AG-PL	1
Met-AG-PL	1
Homocys-AG-PL	1

5

Préparation : comme pour l'exemple 1.

La solution 14 est administrée par injection sous-cutanée, à raison de 0,8 ml de solution 2 à 3 fois par jour en cas de crise. En cas d'état migraineux permanent, on administre de préférence 0,8 ml de solution tous les 2 à 3 jours.

10 Sur trois cas traités, on observe un arrêt de la crise ou une atténuation de l'état migraineux.

Exemple 8 : Préparation d'une association pharmaceutique pour le traitement des polyarthrites.

15 La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une affection à caractère autoimmun dont l'étiologie demeure inconnue.

Les rhumatismes inflammatoires entraînent une atteinte importante des articulations avec déformations invalidantes et douleurs intenses.

20 On ne connaît pas de traitement spécifique pour la PR. Les principaux médicaments utilisés : sels d'or, D-penicillamine, sulfasalazine, méthotrexate, antimalariques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, immunodépresseurs, immunostimulants, agissent soit sur l'immunité, soit sur l'inflammation. Mais, ces médicaments présentent des limites et des inconvénients :

- à court terme, ils ont une efficacité partielle et chez certains malades seulement ;
- 25 – à long terme, il n'existe aucune preuve de leur efficacité, sinon de nombreux effets secondaires (troubles gastro-intestinaux, immunodépression, etc...) ;
- ils ne sont pas anodins, entraînant parfois des accidents graves.

On a préparé les solutions suivantes :



## Solution 15

Farcys-PL-Pal	1
Pal-PL-Myr	1
Farcys-PL-Myr	1
Lin2-PL-Ole	1
Met-PL-Nac	1
Cys-PL-Nac	1
Homocys-PL-Nac	1
Farcys-PL-Ole	1
Met-AG-PL	1
Pal-PL-Ole	1
Myr-PL-Ole	1
Tau-AG-PL	2
VitC-PL	2
Tau-G-PL	2
Stea-PL-Farcys	2
ACh-AG-PL	2
otoco-PL	2
Aze-PL-Ole	2

## Solution 17

Farcys-PL-Pal	1
Pal-PL-Myr	1
Farcys-PL-Myr	1
Farcys-PL-Ole	1
Myr-PL-Ole	1
Stea-PL-Farcys	1
ACh-AG-PL	2
otoco-PL	2

AI = 0,1 mg/ml

## Solution 16

Farcys-PL-Pal	1
Farcys-PL-Myr	1
Pal-PL-Myr	1
Aze-PL-Ole	1
Pal-PL-Ole	1
Farcys-PL-Ole	1
PO-PL-Aze	1
Ole-PL-Myr	1
Stea-PL-Farcys	1
Ole-PL-Laur	1

Préparation : comme pour l'exemple 1.

Selon la forme clinique de la polyarthrite rhumatoïde, l'administration, par voie sous-  
 5 cutanée, des solutions 15, 16 et 17 varie.

a) en période de poussée ou d'aggravation, on utilise les solutions 15 et 16, à raison d'un mélange de 0,1 ml à 0,5 ml de chaque solution, une à deux fois par jour.

b) en phase chronique, on utilise alternativement :

– soit les solutions 15 et 16 mélangées ensemble ;

5      – soit les solutions 16 et 17 mélangées ensemble

à raison de 0,1 ml à 0,5 ml de chaque solution, tous les 2, 3 ou 4 jours ou toutes les semaines.

On constate chez les sujets (n = 150) traités une évolution favorable de la polyarthrite rhumatoïde dans 80 % des cas, même pour des affections anciennes rebelles aux autres  
10      thérapeutiques.

#### Références bibliographiques

1. Daverat et al., J. Neuroimmunol. : 22, 129–134 (1989)
- 15   2. Amara et al., AIDS : 8, 711–713 (1994)
3. Maneta-Peyret et al., Neuroscience Letters : 80, 235–239 (1987)
4. Brochet et al., Current Concepts in Multiple Sclerosis : 10, 97–102 (1991)
5. Boullème et al., Satellite Symposium to 17th ENA Meeting, Prague, Septembre 1994
6. Buttke et al., Immunology Today : 15, 7–10 (1994)
- 20   7. Hunter et al., Neurochem. Res. : 10, 1645–1652 (1985)
8. Korpela et al., J. Neurol. Sci. : 91, 79–84 (1989)
9. Roederer et al., Pharmacol. : 46, 121–129 (1993)
10. Staal et al., The Lancet : 339, 909–912 (1992)
11. Geffard et al., Science : 229, 77–79 (1985)
- 25   12. Souan et al., Neuroscience Letters : 64, 23–28 (1986)
13. Geffard et al., J. Neurochem. : 44, 1221–1228 (1985)
14. Geffard et al., Neurochem. Int. : 7, 403–413 (1985)
15. Seguela et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA : 81, 3888–3892 (1984)
16. Geffard et al., C.R. Acad. Sci. Paris : 295, 797–802 (1982)
- 30   17. Geffard et al., Brain Res. : 294, 161–165 (1984)
18. Chagnaud et al., Polycyclic Aromatic compounds : 663–672 (1993) (Ph. Garrigues and M. Lamotte Eds., Gordon and Breach Science Publishers)
19. Chagnaud et al., Polycyclic Aromatic compounds : 1119–1126 (1993) (Ph. Garrigues and M. Lamotte Eds., Gordon and Breach Science Publishers)
- 35   20. Chagnaud et al., Anti-cancer drugs : 5, 361–366 (1994)
21. Campistron et al., Brain Research : 365, 179–184 (1986)

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un conjugué monofonctionnel et/ou polyfonctionnel entre d'une part la polylysine et d'autre part une ou plusieurs molécule(s) choisie(s) parmi :

5 a) - les (di)acides gras à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, comprenant de 4 à 24 atomes de carbone ;

- les composés impliqués dans le mécanisme d'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, ces composés intervenant notamment dans le cycle du mévalonate, en particulier les isoprénoïdes liés à une cystéine ;

10 - le cholestérol et ses dérivés, notamment les hormones hydrophobes ;

b) - la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou un de leurs dérivés ;

- la cystéine et ses dérivés, de formule :

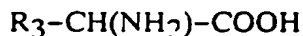


dans laquelle  $R_1$  représente H ou  $CH_3$  et  $R_2$  représente un  $C_1-C_3$  alkylène ;

15 c) - les indolealkylamines ;

- les catécholamines ;

- les acides aminés de formule :



dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle,

20 un groupe carboxyméthyle ou un groupe aminopropyle ;

- les acides amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfoniques ou sulfiniques ;

- la carnitine ou la carnosine ;

- les diamines de formule :



25 dans laquelle A représente un ( $C_1-C_6$ )alkylène ou un groupe  $-(CH_2)_m-$

$NH-B-(CH_2)_p-$  dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe  $-(CH_2)_n-NH-$ , n étant un entier allant de 1 à 5 ;

- l'acétylcholine et

30 - l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

pour la préparation d'une composition ou association pharmaceutique utile dans le traitement de la dégénérescence neuronale et des neuropathies infectieuses, traumatiques et toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmun, des troubles neurodégénératifs consécutifs à des affections génétiques et des affections prolifératives.

35 2. Utilisation selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition ou association pharmaceutique utile pour le traitement des troubles de la mémoire, démence

vasculaire, troubles post-encéphalitiques, troubles post-apoplectiques, syndromes post-traumatiques dus à un traumatisme crânien, troubles dérivant d'anoxies cérébrales, maladie d'Alzheimer, démence sénile, démence subcorticale telle que la chorée de Huntington et la maladie de Parkinson, démence provoquée par le SIDA, neuropathies dérivés de morbidité  
 5 ou dommage des nerfs sympathiques ou sensoriels, maladies cérébrales telles que l'œdème cérébral, dégénérescences spinocérébelleuses, neuropathies consécutives à une maladie de Lyme, affections présentant des troubles neurodégénératifs telles que la maladie de Charcot-Marie Tooth, sclérose latérale amyotrophique, sclérose en plaques, épilepsies, migraines, polyarthrites, diabète insulino-dépendant, lupus érythémateux disséminé,  
 10 thyroïdite de Hashimoto, maladie de Horton, dermatomyosite ou polymyosite, spondylarthrite ankylosante, infection à VIH ou cancers.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ledit conjugué monofonctionnel est un conjugué entre la polylysine et un (di)acide gras.

4. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que  
 15 ledit conjugué polyfonctionnel est un conjugué bifonctionnel et en ce que au moins une des molécules dudit conjugué bifonctionnel est un (di)acide gras.

5. Utilisation selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisée en ce que le (di)acide gras est choisi parmi l'acide myristique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique ou l'acide azélaïque.

20 6. Conjugués monofonctionnels entre d'une part la polylysine et d'autre part une molécule choisie parmi :

- une hormone hydrophobe ;
- la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou un de leurs dérivés ;
- un acide aminé de formule :

25 
$$R_3-CH(NH_2)-COOH$$

dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle ou un groupe aminopropyle ;

- un acide amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfonique ou sulfinique;
- la carnitine ou la carnosine ; ou
- 30 - une diamine de formule :



dans laquelle A représente un ( $C_1-C_6$ )alkylène ou un groupe  $-(CH_2)_m-NH-B-(CH_2)_p-$  dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe  $-(CH_2)_n-NH-$ , n étant un entier allant de 1 à 5.

35 7. Conjugués polyfonctionnels entre d'une part au moins deux molécules choisies parmi :

- les (di)acides gras à chaîne linéaire ou ramifiée, saturés ou insaturés, comprenant de 4 à 24 atomes de carbone ;

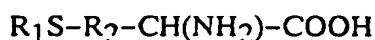
- les composés impliqués dans le mécanisme d'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, ces composés intervenant notamment dans le cycle du mévalonate, en particulier

5 les isoprénoïdes liés à une cystéine ;

- le cholestérol et ses dérivés, notamment les hormones hydrophobes ;

- la vitamine A, la vitamine C, la vitamine E ou un de leurs dérivés ;

- la cystéine et ses dérivés, de formule :

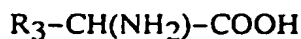


10 dans laquelle  $R_1$  représente H ou  $CH_3$  et  $R_2$  représente un  $C_1-C_3$  alkylène.

- les indolcalkylamines;

- les catécholamines;

- les acides aminés de formule :



15 dans laquelle  $R_3$  représente l'hydrogène, un groupe imidazol-2-ylméthyle, un groupe carboxyméthyle ou un groupe aminopropyle ;

- les acides amino( $C_1-C_5$ )alkylsulfoniques ou sulfiniques;

- la carnitine ou la carnosine;

- les diamines de formule :

20  ${}_2HN-A-NH_2$

dans laquelle A représente un ( $C_1-C_6$ )alkylène ou un groupe  $-(CH_2)_m-NH-B-(CH_2)_p-$  dans lequel m et p, indépendamment l'un de l'autre, sont des entiers allant de 1 à 5, et B représente rien ou un groupe  $-(CH_2)_n-NH-$ , n étant un entier allant de 1 à 5 ;

- l'acétylcholine et

25 - l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique.

et d'autre part au moins une molécule de polylysine.

8. Conjugués selon la revendication 7, qui sont des conjugués bifonctionnels.

9. Compositions ou associations pharmaceutiques, qui comprennent au moins un conjugué tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 8.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,94 27151 (GEFFARD MICHEL) 24 November 1994 see page 4, line 17 - line 22 see page 4, line 30 - line 34 see page 9, line 5 - line 13; claims 1,4-10 ---	1-9
A	WO,A,93 25197 (AFFYMAX TECH NV ;HALE RON L (US); LU AMY (US); SOLAS DENNIS (US);) 23 December 1993 ---	1-9
X	WO,A,91 13097 (OFFORD ROBIN EWART ;ROSE KEITH (CH)) 5 September 1991 see page 5, paragraph 2; claims see page 7, paragraph 2 --- -/-	1,2,6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 1996

Date of mailing of the international search report

22. 03. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01517

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,79 00515 (UNIV BOSTON) 9 August 1979 see page 7, line 5 - line 22 see page 19, line 8 - line 12; claims 1,4,1 ---	1,2,6,9
X	EP,A,0 210 412 (HOECHST AG) 4 February 1987 see page 18, line 33 - page 19, line 5; claims 1,5,6 see page 68, paragraph G see page 22, paragraph III ---	1-9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 17, 24 October 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 195099, CITRO, G. ET AL 'Inhibition of leukemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myb antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells' see abstract & BR. J. CANCER (1994), 69(3), 463-7 CODEN: BJCAAI;ISSN: 0007-0920, ---	1,2,6,9
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 15, NEW YORK US, pages 61-67, A. KAMMEYER ET AL. 'PREPARATION OF MONOCLONAL MOUSE ANTIBODIES AGAINST TWO SPECIFIC EU-MELANIN RELATED COMPOUNDS.' see page 62, column 1, line 1-2; tables II,III ---	1,2,6,9
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 81, WASHINGTON US, pages 3888-3892, PHILIPPE SEQUELA ET AL. 'ANTIBODIES AGAINST GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID: SPECIFICITY STUDIES AND IMMUNOCYTOCHEMICAL RESULTS.' cited in the application see page 3890, column 2, paragraph 2; figure 1; table 1 ---	1,2,9
A	WO,A,92 16221 (SYNERGEN INC) 1 October 1992 see page 28, line 6 - page 29, line 18; claims ---	7,8

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01517

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BRAIN RES. (1986), 365(1), 179-84 CODEN: BRREAP;ISSN: 0006-8993, CAMPISTRON, GHISLAINE ET AL 'Specific antibodies against aspartate and their immunocytochemical application in the rat brain' see page 180, column 1, paragraph 1 -----</p>	1,2,6,9



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9427151	24-11-94	FR-A- 2705234	25-11-94
WO-A-9325197	23-12-93	AU-B- 4534593	04-01-94
		AU-B- 6764794	29-08-94
		CA-A- 2153243	18-08-94
		EP-A- 0647133	12-04-95
		EP-A- 0683668	29-11-95
		WO-A- 9417792	18-08-94
WO-A-9113097	05-09-91	NONE	
WO-A-7900515	09-08-79	US-A- 4701521	20-10-87
		EP-A,B 0009498	16-04-80
		US-A- 4847240	11-07-89
EP-A-0210412	04-02-87	DE-A- 3546150	22-01-87
		AT-T- 131491	15-12-95
		AU-B- 611385	13-06-91
		AU-B- 5894386	08-01-87
		DE-D- 3650448	25-01-96
		FI-B- 94419	31-05-95
		JP-A- 62063600	20-03-87
		NO-B- 174207	20-12-93
		SU-A- 1823876	23-06-93
WO-A-9216221	01-10-92	AU-B- 1674292	21-10-92
		CA-A- 2106079	16-09-92
		EP-A- 0575545	29-12-93
		JP-T- 6506218	14-07-94
		NO-A- 933270	01-11-93

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche Internationale No  
PCT/FR 95/01517

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO,A,94 27151 (GEFFARD MICHEL) 24 Novembre 1994 voir page 4, ligne 17 - ligne 22 voir page 4, ligne 30 - ligne 34 voir page 9, ligne 5 - ligne 13; revendications 1,4-10 ---	1-9
A	WO,A,93 25197 (AFFYMAX TECH NV ;HALE RON L (US); LU AMY (US); SOLAS DENNIS (US);) 23 Décembre 1993 ---	1-9
X	WO,A,91 13097 (OFFORD ROBIN EWART ;ROSE KEITH (CH)) 5 Septembre 1991 voir page 5, alinéa 2; revendications voir page 7, alinéa 2 ---	1,2,6
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Berte, M

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D   nde Internationale No  
PCT/FR 95/01517

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,79 00515 (UNIV BOSTON) 9 Août 1979 voir page 7, ligne 5 - ligne 22 voir page 19, ligne 8 - ligne 12; revendications 1,4,1 ---	1,2,6,9
X	EP,A,0 210 412 (HOECHST AG) 4 Février 1987 voir page 18, ligne 33 - page 19, ligne 5; revendications 1,5,6 voir page 68, alinéa G voir page 22, alinéa III ---	1-9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 17, 24 Octobre 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 195099, CITRO, G. ET AL. 'Inhibition of leukemia cell proliferation by folic acid-polylysine-mediated introduction of c-myb antisense oligodeoxynucleotides into HL-60 cells' voir abrégé & BR. J. CANCER (1994), 69(3), 463-7 CODEN: BJCAAI;ISSN: 0007-0920, ---	1,2,6,9
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 15, NEW YORK US, pages 61-67, A. KAMMEYER ET AL. 'PREPARATION OF MONOCLONAL MOUSE ANTIBODIES AGAINST TWO SPECIFIC EU-MELANIN RELATED COMPOUNDS.' voir page 62, colonne 1, ligne 1-2; tableaux II,III ---	1,2,6,9
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 81, WASHINGTON US, pages 3888-3892, PHILIPPE SEGUELA ET AL. 'ANTIBODIES AGAINST GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID: SPECIFICITY STUDIES AND IMMUNOCYTOCHEMICAL RESULTS.' cité dans la demande voir page 3890, colonne 2, alinéa 2; figure 1; tableau 1 ---	1,2,9
A	WO,A,92 16221 (SYNERGEN INC) 1 Octobre 1992 voir page 28, ligne 6 - page 29, ligne 18; revendications ---	7,8
	-/--	

# **RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Recherche Internationale No  
PCT/FR 95/01517

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BRAIN RES. (1986), 365(1), 179-84 CODEN: BRREAP;ISSN: 0006-8993, CAMPISTRON, GHISLAINE ET AL 'Specific antibodies against aspartate and their immunocytochemical application in the rat brain' voir page 180, colonne 1, alinéa 1 -----</p>	1,2,6,9

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête Internationale No

PCT/FR 95/01517

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9427151	24-11-94	FR-A- 2705234	25-11-94
WO-A-9325197	23-12-93	AU-B- 4534593 AU-B- 6764794 CA-A- 2153243 EP-A- 0647133 EP-A- 0683668 WO-A- 9417792	04-01-94 29-08-94 18-08-94 12-04-95 29-11-95 18-08-94
WO-A-9113097	05-09-91	AUCUN	
WO-A-7900515	09-08-79	US-A- 4701521 EP-A, B 0009498 US-A- 4847240	20-10-87 16-04-80 11-07-89
EP-A-0210412	04-02-87	DE-A- 3546150 AT-T- 131491 AU-B- 611385 AU-B- 5894386 DE-D- 3650448 FI-B- 94419 JP-A- 62063600 NO-B- 174207 SU-A- 1823876	22-01-87 15-12-95 13-06-91 08-01-87 25-01-96 31-05-95 20-03-87 20-12-93 23-06-93
WO-A-9216221	01-10-92	AU-B- 1674292 CA-A- 2106079 EP-A- 0575545 JP-T- 6506218 NO-A- 933270	21-10-92 16-09-92 29-12-93 14-07-94 01-11-93